

DOCKET NO.: 217039 US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Naokazu TAKEDA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/04095

INTERNATIONAL FILING DATE: June 22, 2000

FOR: SRSV DETECTION KIT

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

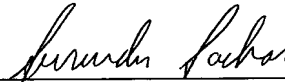
COUNTRY
Japan

APPLICATION NO
11-175928

DAY/MONTH/YEAR
22 June 1999

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP00/04095. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

PCT/JPC0/04095

09/926799

22.06.00

JP 00/4095
日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 6月22日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第175928号

出願人
Applicant(s):

国立感染症研究所長
デンカ生研株式会社

REC'D 11 AUG 2000

WIPO PCT

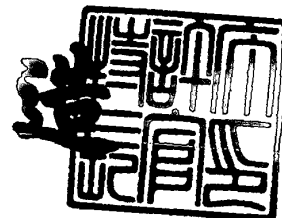
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月28日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3058406

【書類名】 特許願
【整理番号】 P02481106
【提出日】 平成11年 6月22日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区戸山一丁目 2 3 番 1 号 国立感染症研究所
内

【氏名】 武田 直和

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区戸山一丁目 2 3 番 1 号 国立感染症研究所
内

【氏名】 名取 克郎

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区戸山一丁目 2 3 番 1 号 国立感染症研究所
内

【氏名】 宮村 達男

【発明者】

【住所又は居所】 新潟県五泉市南本町一丁目 2 番 2 号 デンカ生研株式会
社内

【氏名】 鎌田 公仁夫

【発明者】

【住所又は居所】 新潟県五泉市南本町一丁目 2 番 2 号 デンカ生研株式会
社内

【氏名】 佐藤 俊則

【発明者】

【住所又は居所】 新潟県五泉市南本町一丁目 2 番 2 号 デンカ生研株式会
社内

【氏名】 佐藤 征也

【特許出願人】

【識別番号】 591222245

【氏名又は名称】 国立感染症研究所長

【特許出願人】

【識別番号】 591125371

【氏名又は名称】 デンカ生研株式会社

【代理人】

【識別番号】 100068700

【弁理士】

【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562

【弁理士】

【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100106909

【弁理士】

【氏名又は名称】 棚井 澄雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011752

【納付金額】 21,000円

特平 1 1－1 7 5 9 2 8

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 S R S V 検出キット

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 S R S V 関連ウイルス (a) ~ (j) よりなる群から選択された一つのウイルス株に対する抗体を全て含有することを特徴とする S R S V 検出キット；

(a) 6 4 5 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 8 5 % 以上の相同性を有するウイルス株、

(b) 1 2 4 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 8 5 % 以上の相同性を有するウイルス株、

(c) 2 5 8 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 8 5 % 以上の相同性を有するウイルス株、

(d) C h i b a 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 8 5 % 以上の相同性を有するウイルス株、

(e) 1 0 4 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 8 5 % 以上の相同性を有するウイルス株、

(f) 8 0 9 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 8 5 % 以上の相同性を有するウイルス株、

(g) 7 5 4 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 8 5 % 以上の相同性を有するウイルス株、

(h) 7 6 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 8 5 % 以上の相同性を有するウイルス株、

(i) 4 7 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 8 5 % 以上の相同性を有するウイルス株、

(j) 7 k 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 8 5 % 以上の相同性を有するウイルス株。

【請求項 2】 抗体が、中空ウイルス粒子を免疫して作製されたものである請求項 1 記載の S R S V 検出キット。

【請求項 3】 S R S V の血清型を判別するものである請求項 1 記載の S R

SV検出キット。

【請求項4】 下記SRSV関連ウイルス(a)～(d)よりなる群から選択された一つのウイルス株に対する抗体を全て含有することを特徴とするSRSV遺伝子型判別のためのSRSV検出キット；

(a) 645株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するウイルス株、

(b) 124株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するウイルス株、

(c) 258株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するウイルス株、

(d) Chiba株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するウイルス株。

【請求項5】 下記SRSV関連ウイルス(e)～(j)よりなる群から選択された一つのウイルス株に対する抗体を全て含有することを特徴とするSRSV遺伝子型判別のためのSRSV検出キット；

(e) 104株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するウイルス株、

(f) 809株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するウイルス株、

(g) 754株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するウイルス株、

(h) 76株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するウイルス株、

(i) 47株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するウイルス株、

(j) 7k株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するウイルス株。

【請求項6】 抗体を担体に固定化した抗体固相担体でSRSVを捕捉するものである請求項1～5記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、検体中の小型球形ウイルス (Small Round Structured Virus、以下「SRSV」という) を検出、判別するためのキットに関する。

【0002】

【従来の技術】

SRSVは、1973年に発見されたヒトのウイルス性胃腸炎の原因ウイルスの一つであり、小児期の急性胃腸炎や成人や年長児に食中毒様の集団発生を引き起こすことが知られている。SRSVは、細胞培養によってウイルスを増殖させることができず且つ感受性を示す動物モデルもないことから、SRSV抗原及び抗SRSV抗体の入手は困難であり、当該ウイルスの免疫血清学的な検出法の開発は遅れていた。

【0003】

斯かる状況の下、1993年にSRSVの一つであるノーウォーク (Norwalk) ウイルスの遺伝子クローニングが成功し全ゲノムの塩基配列が解析され (特表平6-506823号公報)、その後RNAポリメラーゼ領域の一部を増幅するPCR法が開発され、これまでに14種類のSRSV関連ウイルスが見出されている。更にこれらのRNAポリメラーゼ領域の約120アミノ酸についての分析により、SRSVはノーウォークウイルス株をプロトタイプとする遺伝子型Iとスノーマウンテン (Snow Mountain) ウイルス株をプロトタイプとする遺伝子型IIの大きく2つの遺伝子型 (genogroup) に分類できるとされている。

【0004】

しかし、SRSV関連ウイルスの遺伝子解析が進むにつれ、同一遺伝子型内でも多くの多様性があることが知られ、実際に各遺伝子型のプロトタイプであるノーウォークウイルス株及びスノーマウンテンウイルス株の遺伝子に対するプライマーを用いたRT-PCR法では、全てのSRSVを検出できず、SRSVを効率良く増幅させるプライマーの構築やRT-PCR法の条件の設定は非常に困難であることが明らかとなった。

【0005】

一方、遺伝子発現により、ノーウォークウイルス株、スノーマウンテンウイルス株等の一部のウイルスについては抗原が作製され、抗体の取得及びこれを用いたELISAによるSRSV検出法も構築されているが、SRSVの多様性により胃腸炎を引き起こす全てのSRSVを確実に検出することができなかった。

【0006】

他方、わが国では、平成9年にSRSVが食品衛生法における食中毒原因因子に指定され、SRSVによる食中毒が発生した場合にはその感染ルートの特定が必須となり、感染者の便及び食品中のSRSVを簡便で且つ確実に検出同定する方法が望まれていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、検体からこれまでに見出されているSRSV関連ウイルスを簡易に検出でき、その血清型及び遺伝子型を確実に判別できるキットを提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、斯かる実状に鑑みSRSV関連ウイルスについて遺伝学的及び免疫学的に検討したところ、10種のSRSV関連ウイルスより得られる抗体を組み合わせる用いることにより、検体中のSRSVを検出でき、SRSVの血清型及び遺伝子型を確実に判別できることを見出し、本発明を完成した。

【0009】

即ち、本発明は、下記SRSV関連ウイルス(a)～(j)；

(a) 645株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の同一性を有するウイルス株、

(b) 124株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の同一性を有するウイルス株、

(c) 258株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の同一性を有するウイルス株、

(d) Chiba 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85%以上の相同性を有するウイルス株、

(e) 104 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85%以上の相同性を有するウイルス株、

(f) 809 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85%以上の相同性を有するウイルス株、

(g) 754 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85%以上の相同性を有するウイルス株、

(h) 76 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85%以上の相同性を有するウイルス株、

(i) 47 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85%以上の相同性を有するウイルス株、

(j) 7k 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85%以上の相同性を有するウイルス株、

よりなる群から選択された一つのウイルス株に対する抗体を全て含有することを特徴とする SRSV 検出キットを提供するものである。

【0010】

また本発明は、下記 SRSV 関連ウイルス (a) ~ (d) ;

(a) 645 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85%以上の相同性を有するウイルス株、

(b) 124 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85%以上の相同性を有するウイルス株、

(c) 258 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85%以上の相同性を有するウイルス株、

(d) Chiba 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85%以上の相同性を有するウイルス株、

よりなる群から選択された一つのウイルス株に対する抗体を全て含有することを特徴とする SRSV 遺伝子型判別のための SRSV 検出キットを提供するものである。

更に本発明は、下記 SRSV 関連ウイルス (e) ~ (j) ;

(e) 104 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85% 以上の相同性を有するウイルス株、

(f) 809 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85% 以上の相同性を有するウイルス株、

(g) 754 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85% 以上の相同性を有するウイルス株、

(h) 76 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85% 以上の相同性を有するウイルス株、

(i) 47 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85% 以上の相同性を有するウイルス株、

(j) 7k 株又はそれと構造遺伝子領域の塩基配列において 85% 以上の相同性を有するウイルス株、

よりなる群から選択された一つのウイルス株に対する抗体を全て含有することを特徴とする SRSV 遺伝子型判別のための SRSV 検出キットを提供するものである。

【0011】

【発明の実施の形態】

1. SRSV 関連ウイルス

本発明の SRSV 検出キットは、前記 (a) ~ (j) の 10 種類の SRSV 関連ウイルスに対する抗体を用いることを特徴とするものである。ここで、SRSV 関連ウイルスとは、645 株、124 株、258 株、Chiba 株、104 株、809 株、754 株、76 株、47 株及び 7k 株のウイルス並びに当該ウイルスと構造遺伝子領域の塩基配列において 85% 以上の相同性を有するウイルスを意味する。

【0012】

645 株とは、現在までにジーンバンクに登録されている Desert Shield/90/SA 株 (ジーンバンク登録番号: U04469) と構造遺伝子の相同性が 85% 以上であり、かつ G1/F2 (配列番号 5) 及び Oligo-

d T (配列番号9) のプライマーセットを用いたPCR法で図1で示される (r 645) 遺伝子が増幅される日本のSRSV感染患者の糞便由来株を意味する。また、これと構造遺伝子領域の塩基配列において85%の相同性を有するものとして、例えばDesert Shield/90/SA株 (ジーンバンク登録番号: U04469) 等が挙げられる。

【0013】

124株とは、現在までにジーンバンクに登録されているNorwalk/68/US株 (ジーンバンク登録番号: M876611) と構造遺伝子の相同性が85%以上であり且つG1/F2 (配列番号5) 及びG1/R0 (配列番号6) のプライマーセットを用いたPCR法で図1で示される (r 124) 遺伝子が増幅される日本のSRSV感染患者の糞便由来株を意味する。また、これと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するものとしては、例えばKY-89/89J株 (ジーンバンク登録番号: L23828) 及びNorwalk/68/US株 (ジーンバンク登録番号: M876611) 等が挙げられる。

【0014】

258株とは、現在までにジーンバンクに登録されているSouthampton/91/UK株 (ジーンバンク登録番号: L07418) と構造遺伝子の相同性が90%以上であり且つG1/F2 (配列番号5) 及びオリゴ-d T (配列番号9) のプライマーセットを用いたPCR法で図1で示される (r 258) 遺伝子が増幅される日本のSRSV感染患者の糞便由来株を意味する。また、これと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するものとしては、例えばSouthampton/91/UK (ジーンバンク登録番号: L07418) 等が挙げられる。

【0015】

Chiba株とは、現在までにジーンバンクに登録されている全てのSRSV関連ウイルス株 (下記表1) と構造遺伝子の相同性が80%以下であり且つD5 (配列番号1) 及びCV-U4 (配列番号2) のプライマーセットを用いたPCR法で図1で示される (r CV) 遺伝子が増幅される日本のSRSV感染患者の

糞便由来株を意味する。

【0016】

104株とは、現在までにジーンバンクに登録されているCamberwell/94/AU株（ジーンバンク登録番号：U46500）と構造遺伝子の相同性が90%以上であり且つ97k104/F1（配列番号3）及び97k104/R1（配列番号4）のプライマーセットを用いたPCR法で図1で示される（r104）遺伝子が増幅される日本のSRSV感染患者の糞便由来株を意味する。また、これと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するものとしては、例えばBristol/93/UK株（ジーンバンク登録番号：X76716）、Lordsdale/93/UK（ジーンバンク登録番号：X86557）、Camberwell/94/AU株（ジーンバンク登録番号：U46500）等が挙げられる。

【0017】

76株とは、現在までにジーンバンクに登録されているHawaii/71/US株（ジーンバンク登録番号：U07611）と構造遺伝子の相同性が90%以上であり且つG2/F3（配列番号7）及びG2R0（配列番号8）のプライマーセットを用いたPCR法で図1で示される（r76）遺伝子が増幅される日本のSRSV感染患者の糞便由来株を意味する。また、これと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するものとしては、例えばHawaii/71/US株（ジーンバンク登録番号：U07611）等が挙げられる。

【0018】

47株とは、現在までにジーンバンクに登録されている全てのSRSV関連ウイルス株（下記表1）と構造遺伝子の相同性が80%以下であり且つ97k104/F1（配列番号3）及びオリゴdT（配列番号9）のプライマーセットを用いたPCR法で図1で示される（r47）遺伝子が増幅される日本のSRSV感染患者の糞便由来株を意味する。

【0019】

7k株とは、現在までにジーンバンクに登録されている全てのSRSV関連ウイルス株（下記表1）と構造遺伝子の相同性が80%以下であり且つG1/F2

(配列番号5) 及びオリゴ d T (配列番号9) のプライマーセットを用いた PCR法で図1で示される (r 7 k) 遺伝子が増幅される日本の S R S V感染患者の糞便由来株を意味する。

【0020】

754株とは、現在までにジーンバンクに登録されている S n o w M o u n t a i n / 7 6 / U S 株 (ジーンバンク登録番号: U 7 0 0 5 9) と構造遺伝子の相同性が90%以上であり且つ G 2 / F 3 (配列番号7) 及び S M V - R 1 (配列番号10) のプライマーセットを用いた PCR法で図1で示される (r 7 5 4) 遺伝子が増幅される日本の S R S V感染患者の糞便由来株を意味する。また、これと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するものとしては、例えば S n o w M o u n t a i n / 7 6 / U S 株 (ジーンバンク登録番号: U 7 0 0 5 9)、M e l k s h a m / 8 9 / U K 株 (ジーンバンク登録番号: X 8 1 8 7 9) 等が挙げられる。

【0021】

809株とは、現在までにジーンバンクに登録されている T o r o n t o / 7 7 / C A 株 (ジーンバンク登録番号: U 0 2 0 3 0) と構造遺伝子の相同性が85%以上であり且つ G 2 / F 3 (配列番号7) 及び M V - R 1 (配列番号11) のプライマーセットを用いた PCR法で図1で示される (r 7 5 4) 遺伝子が増幅される日本の S R S V感染患者の糞便由来株を意味する。また、これと構造遺伝子領域の塩基配列において85%以上の相同性を有するものとしては、例えば M e x i c o / 8 9 / M E X 株 (ジーンバンク登録番号: U 2 2 4 9 8)、A u c k l a n d 株 (ジーンバンク登録番号: U 4 6 0 3 9 1)、T o r o n t o / 7 7 / C A 株 (ジーンバンク登録番号: U 0 2 0 3 0)、O T H - 2 5 / 8 9 / J (ジーンバンク登録番号: L 2 3 8 3 0) 等が挙げられる。

【0022】

【表 1】

ウイルス株	ジーンバンク 登録番号
Desert Shield/90/SA	U04469
Norwalk/68/US	M876611
KY-89/89J	L23828
OTH-25/89/J	L23830
Southampton/91/UK	L07418
Lordsdale/93/UK	X86557
Bristol/93/UK	X76716
Camberwell/94/AU	U46500
Toronto/77/CA	U02030
Mexico/89/MBX	U22498
Snow Mountain/76/US	U70059
Melksham/89/UK	X81879
Auckland	U460391
Hawaii/71/US	U07611

【 0 0 2 3 】

また、これらの S R S V 関連ウイルスは、その RNA ポリメラーゼ領域の約 1 2 0 アミノ酸についてのホモロジー解析によれば 2 つの遺伝子型に分類することができる。即ち、6 4 5 株、1 2 4 株、2 5 8 株及び C h i b a 株の属する I 型と、1 0 4 株、8 0 9 株、7 5 4 株、7 6 株、4 7 株及び 7 k 株の属する II 型に分類される。

【 0 0 2 4 】

2. S R S V 関連ウイルスに対する抗体

本発明キットの構成成分である抗体は、前記 (a) ~ (j) の各 S R S V 関連ウイルスから遺伝子工学的に作製された中空ウイルス粒子を免疫することにより得ることができる。中空ウイルス粒子は、内部に遺伝子を持たないため感染性はないが、構造がウイルス粒子とほぼ同じ形をしているので、ウイルス粒子と同等な抗原性を持つものである。以下に S R S V 関連ウイルスに対する抗体の取得に

ついて説明する。

【0025】

(1) SRSVの構造遺伝子のクローニング

SRSV感染患者の便よりセチルトリメチルアンモニウムブロマイド法等を用いて、ウイルスRNAを抽出し、オリゴ-dTプライマー及び逆転写酵素によりcDNAを作製し、これと各SRSV関連ウイルスの構造遺伝子領域を増幅するプライマーを用いてPCRを行うことにより構造遺伝子断片を増幅する。

斯かる構造遺伝子断片は、一度大腸菌クローニングベクターを用いてTAクローニングを行いプラスミドに組み込んだ後、バキュロウイルストランスファーベクターに組み込まれる。ここで使用可能なクローニングベクターとしては、大腸菌に代表される原核細胞を宿主とするプラスミド及びλファージ等に代表されるバクテリオファージ由来のベクター等公知のものを使用でき、クローニングベクターとその宿主細胞とを適当に組み合わせて使用することが望ましい。クローニングベクターの具体的な例としては、pBR322、pUC19、pCRII等が挙げられる。また、遺伝子の挿入方法は公知の常法に従えばよく、これらのベクターの構築にあたっては、遺伝子操作の容易である大腸菌系を使用することが望ましい。

【0026】

(2) SRSV中空ウイルス粒子の作成

SRSV関連ウイルスの構造遺伝子領域を組み込んだプラスミドを、構造遺伝子領域を切断しない制限酵素で消化し構造遺伝子領域を回収し、例えばpVL1393等のバキュロウイルストランスファーベクターに組み込む。斯かるトランスファーベクターと直鎖状で増殖必須遺伝子領域を欠失させてあるバキュロウイルスDNAと共にトランスフェクションし、昆虫細胞内で相同組換えを起こさせることにより目的とする組換えバキュロウイルスを作製することができる。

得られた組換えバキュロウイルスをSf9細胞、Tn5細胞等の昆虫細胞に感染させ、常法により適当な成育条件下で培養することによりSRSVの構造蛋白を発現させ、自己集合させることにより中空ウイルス粒子を生産させることができる。生化学的な精製法例えば遠心分離等を用いれば中空ウイルス粒子を分離精

製することができる。中空ウイルス粒子が形成されているかどうかは、ウラニル酢酸でネガティブ染色し、電子顕微鏡で検鏡することにより確認することができる。

【0027】

(3) 中空ウイルス粒子を用いた免疫抗体の作製

精製された各SRSV関連ウイルスの中空ウイルス粒子を常法に従ってウサギに7～10日間免疫し、分離血清より中空ウイルス粒子に対するIgG抗体（抗SRSV抗体）を取得することができる。尚、抗体の分離精製にはDEAEセファロースクロマトグラフィー等の手段が用いられる。

【0028】

かくして得られる本発明の10種類の中空ウイルス粒子と対応する抗SRSV抗体を用いて、その交差反応性を測定すると表2に示すように各SRSV関連ウイルス間では交差反応は全く示さない。従って、本発明のSRSVの検出法によれば、SRSVの10種類の血清型を同時に判別することが可能である。また、このことは同時に遺伝子型Iと遺伝子型IIの判別が可能であることも示している。

【0029】

3. SRSV関連ウイルスの検出

上記で得られた各抗SRSV抗体を用いた検体中のSRSVの検出は、通常用いられる抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法、例えばサンドイッチ法によるラジオイムノアッセイや酵素免疫測定法等を用いることができるが、特にELISAが好ましい。即ち、10種類の抗SRSV抗体をマイクロプレートに分注してSRSVスクリーニングプレートを作製し、SRSV感染患者の便から調製した便乳剤の希釈液を当該プレートのウェルに加えて反応させた後、各ウイルスのパーオキシダーゼ（POD）標識抗SRSV抗体を加えて反応させる。次いで基質液（TMB）を加えて反応させた後、0.6N硫酸を加えて反応を停止させ、ELISAオートリーダーでウェルの吸光度（450nm/630nm）を測定することによりSRSVを検出できる。

【0030】

ここで、検体中のSRSVの検出のみを行う場合には、10種類の抗SRSV抗体全てを混合固定化したマイクロプレートを用いたキットとすればよく、SRSVの血清型まで判別する場合には、10種類の抗SRSV抗体全てをそれぞれ別個のプレートに固定化したマイクロプレートを用いたキットとすればよい。

【0031】

また、遺伝子型の判別は、645株、124株、258株及びChiba株の各抗SRSV抗体を混合固定化したマイクロプレート（I型プレート）又は104株、809株、754株、76株、47株及び7k株の各抗SRSV抗体を混合固定化したマイクロプレート（II型プレート）を用いたキットとすることにより可能となる。

【0032】

尚、本発明の各抗SRSV抗体をラテックスや磁気ビーズ等の担体を用いて固定化することにより、検体中のSRSV関連ウイルスを確実に捕捉することができ、ラテックスならば遠心操作、磁気ビーズならば磁石でSRSV捕捉担体を回収することができ、回収後にウイルスRNAを抽出し利用することができる。

【0033】

【実施例】

以下、実施例により本発明のSRSV検出キットを具体的に説明する。

【0034】

実施例1 SRSV関連ウイルスの構造遺伝子のクローニング

（1）cDNA合成

SRSV患者の便（0.5～1.0g）に9mLのPBSと1mLのダイフロンを加え、ホモジナイズした。次いで、3000rpmで20分間遠心してその上清を回収し、10%便乳剤とした。

この便乳剤1mLを用い、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド法によりSRSVのRNAを抽出し、最終的に0.1%ジエチルピロカーボネート液30 μ Lに浮遊させた。この浮遊液を用いて、Oligo-dT（12-18）プライマー及びAMV（Avian Myeloblast sis Virus）（生化学工業社製）由来逆転写酵素によりcDNAを作製した。

【0035】

(2) 構造遺伝子領域の単離

(1) で作製した cDNA と、以下に示す構造遺伝子領域を増幅するプライマーを用いて PCR を行い、PCR 後、アガロースゲル電気泳動法により増幅させた構造遺伝子断片を分離し、SuprecTM-01 (TAKARA) を用いて回収した。

645株：G1/F2 (配列番号5)、Oligo-dT (33) (配列番号9)

124株：G1/F2 (配列番号5)、G1/R0 (配列番号6)

258株：G1/F2 (配列番号5)、Oligo-dT (33) (配列番号9)

Chiba株：D5 (配列番号1)、CV-U4 (配列番号2)

104株：97k104/F1 (配列番号3)、97k104/R1 (配列番号4)

809株：G2/F3 (配列番号7)、MV-R1 (配列番号11)

754株：G2/F3 (配列番号7)、SMV-R1 (配列番号10)

76株：G2/F3 (配列番号7)、G2/R0 (配列番号8)

47株：97k104/F1 (配列番号3)、Oligo-dT (33) (配列番号9)

7k株：G2/F3 (配列番号7)、Oligo-dT (33) (配列番号9)

【0036】

(3) 構造遺伝子のクローニング

回収した構造遺伝子断片を、大腸菌クローニングベクター pCRII (INVITROGEN社製) にTAクローニングを行った。これらのクローンからウイルスの構造遺伝子を組み込むプラスミド pCRII/645、pCRII/124、pCRII/258、pCRII/Chiba、pCRII/104、pCRII/809、pCRII/754、pCRII/76、pCRII/47、pCRII/7kを得た。

【0037】

実施例2 中空ウイルス粒子を産生する組換えバキュロウイルスの作製

(1) トランスベクターの構築

実施例1(3)で得られた構造遺伝子領域を組み込んだプラスミドを構造遺伝子領域を切断しない制限酵素で消化し、アガロースゲル電気泳動法によって分離後、構造遺伝子領域を SuprecTM-01 (TAKARA)により回収した。次いで、回収した遺伝子断片を、同じ制限酵素で消化したバキュロウイルストランスファーベクター pVL1393 (INVITROGEN社製)に組み込み、トランスファーベクターを作製した。

【0038】

(2) 組換えバキュロウイルスの作製

0.5 μ g のバキュロウイルスDNA (Baculo-Gold) と 1 μ g の(1)で得られたトランスファーベクターを 8 μ L の蒸留水に溶解し、2倍希釈した等量のリポフェクチンと混合して室温で15分間放置する。昆虫細胞用培地 Ex-cell 11400 に懸濁した 1×10^5 個の Sf9 細胞を 26.5℃ で 30 分間プラスチックシャーレ (直径 3.5 cm) 内に吸着後、トランスファーベクターと Baculo-Gold 混合液を細胞に滴下し 26.5℃ で培養した。24 時間後、培養液を 10% 牛胎児血清及び 2% BTB (GIBCO BRL 社製) を含む TC100 (GIBCO BRL 社製; 以後 TC100) 培地に交換し、更に培養を継続した。

【0039】

(3) 組換えバキュロウイルスの純化

(2)で得られた組換えバキュロウイルスを5日間培養した後、培養上清を TC100 等の昆虫細胞培養用メEDIUMを用いて10倍に希釈した。その0.1 mLを取り、直径 3.5 cm のプラスチックシャーレに培養した 3×10^6 個の Sf9 細胞に接種した。26.5℃、60分間吸着後1%アガロースME (低融点アガロース) を含む TC100 培養液 2 mL を重層し 26.5℃ で培養した。更に、培養開始後4日目に0.005%のニュートラルレッドを含む TC100 1 mL を重層して 26.5℃ で培養した。翌日出現したブランクをマイクロチップでかき取り、TC100 培地に懸濁した。

【0040】

(4) 組換えバキュロウイルスのシードの作製と感染力価の測定

(3) で得られた懸濁液を 1×10^7 個の Sf9 細胞に接種し、26.5℃、60 分間吸着後 TC100 を加え、26.5℃ で 3 から 4 日間培養した。この培養液を 2500 rpm、10 分間、4℃ で遠心し、培養上清を回収した。この回収した培養上清を、 1×10^7 個の Sf9 細胞に接種し、26.5℃、60 分間吸着後 TC100 を加え、26.5℃ で 3 から 4 日間培養した。

次いで、この培養上清を直径 3.5 cm のプラスチックシャーレに培養した 3×10^6 個の Sf9 細胞に接種し、26.5℃ で 60 分間吸着後 1% アガロース ME (低融点アガロース) を含む TC100 培養液 2 mL を重層し 26.5℃ で培養した。次いで培養開始後 4 日目に 0.005% のニュートラルレッドを含む TC100 を 1 mL 重層して 26.5℃ で培養した。翌日出現したプラークを計測し、組換えバキュロウイルスの感染力価を算出し、組換えバキュロウイルスシードの感染力価とした。

【0041】

実施例 3 中空ウイルス粒子の作製

(1) 組換えバキュロウイルスを用いた構造蛋白の発現

Sf9 昆虫細胞に対して組換えバキュロウイルスを M. O. I. (Multiplicity of infection) 1 から 10 で感染させた。この時、組換えウイルス液を細胞に滴下させ、静かに振とうさせながら約 60 分程度吸着させた。その後、TC100 昆虫細胞用培地を添加し、26.5℃、5 から 6 日間培養した。

【0042】

(2) 発現蛋白の同定

組換えウイルス感染培養上清を経時的に採取し、SDS-PAGE で分離後をクーマシーブルー染色で検出し、予想される分子量により発現蛋白の妥当性を確認した。また、SDS-PAGE で蛋白を分離後ニトロセルロース膜に転写し、SRSV の回復期血清によるウエスタンブロッティング法で発現蛋白を同定した。

【0043】

(3) 中空ウイルス粒子の精製と回収

組換えバキュロウイルスシードをM. O. I. 1から10で感染させ、約60分吸着後、E x - c e l l 400を添加し、26.5℃で3日間培養した。次いで、プロテアーゼ阻害剤、例えばペプスタチンA及びリユーペプチンを培養液に最終濃度1mMになるように加え更に2から3日間培養を続けた。

培養後2500rpm、10分間、4℃で遠心し、培養上清を回収した。回収した培養液を10000rpmで30分間遠心して組換えバキュロウイルスを取り除いた。この上清をベックマンSW28ローターで25000rpm、4時間遠心して中空ウイルス粒子を沈殿させた。次いで、上清を捨てた遠心管を逆さにして、完全に上清を除き、その後プロテアーゼ阻害剤を加えたグレースバッファ―又はPBS(-)0.5mLを各遠心管に加え、4℃一晚静置した。

静置後、加えておいたプロテアーゼ阻害剤入りグレースバッファ―で中空ウイルス粒子を懸濁させ回収した。次いで、回収した中空ウイルス粒子に、CsClを3.8g加えたプロテアーゼ阻害剤入りグレースバッファ―又はPBS(-)を加え13mLとし、16℃、35000rpm、24から48時間超遠心した。超遠心後、中空ウイルス粒子が集まっている青白いバンドを回収し、プロテアーゼ阻害剤入りグレースバッファ―を用いて5倍希釈後、ベックマンTL100.3ローターで45000rpm、3時間超遠心して、中空ウイルス粒子を沈殿させた。

沈殿させた中空ウイルス粒子をプロテアーゼ阻害剤入りグレースバッファ―又はPBS(-)で可溶化した。次いで、10%から50%のショ糖を含むプロテアーゼ阻害剤入りグレースバッファ―溶液を4PAチューブに作り、そこに中空ウイルス粒子可溶化液を重層し、35000rpm、4時間、4℃でショ糖密度勾配遠心を行った。遠心後、中空ウイルス粒子の青白いバンドを26G針付きの1mLシリンジで回収し、精製SRSV中空ウイルス粒子とした。

精製SRSV中空ウイルス粒子をグレースバッファ―で適宜希釈して、Bradford法により蛋白量を測定した。

精製SRSV中空ウイルス粒子は、ウラニル酢酸でネガティブ染色し、電子顕微鏡で検鏡し中空ウイルス粒子を形成しているかを確認した(図2~8)。

【0044】

実施例 4 中空ウイルス粒子を用いた免疫抗体及び標識抗体の作製

(1) 中空ウイルス粒子に対する免疫抗体の作製

645株、124株、258株、Chiba株、104株、809株、754株、76株、47株及び7k株から得られた精製SRSV中空ウイルス粒子500 μ gを含む1mLのリン酸緩衝液(pH7.2)と1mLのフロインドの不完全アジュバントを混合し、3kgのニュージーランド白色ウサギに常法に従って免疫した。3週間後、0.25 μ gのSRSV中空ウイルス粒子を含むリン酸緩衝液(pH7.2)1mLとフロインドの不完全アジュバント1mLを混合して免疫した(追加免疫)。次いで、3週間後追加免疫と同様に免疫を行い、この約7から10日間後に全採血し、血清成分を分離した。

分離精製した血清を硫酸分画後、50mM Tris-HCl(pH7.6)で4℃、一晚透析した。次いで50mM Tris-HCl(pH7.6)で平衡化したDEAEセファロースクロマトグラフィーにかけ、UV波長280nmでモニタリングし、O.D.のピークを集めて、中空ウイルス粒子に対するDEAE精製IgG抗体(抗SRSV抗体)とした。

【0045】

(2) 標識抗体の作製

抗SRSV抗体を過ヨウ素酸改良法[酵素免疫測定法、2:91(1982)]でPOD標識した。即ちPODを4mg/mLになるように蒸留水で溶解し、0.1M過ヨウ素酸ナトリウム0.2mLを加え、室温で約20分間反応させた。次いで1mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)で一晩透析した。透析後、0.2M炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.5)を0.02mL加え、pH9.5にすると同時に抗SRSV抗体を8mg加えた。

室温で約2時間反応させ、4mg/mL水酸化ホウ素ナトリウムを0.1mL加え、4℃で約2時間反応させた。反応後、10mMリン酸バッファーを用いてセファクリルS-200によるゲル濾過を行い、UV波長280nmでモニタリングしてPOD標識抗SRSV抗体画分を集めた。

【0046】

(3) 抗SRSV抗体固相プレートの作製

抗SRSV抗体を炭酸バッファー (pH 9.5) で各々 0.5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度に希釈し、ポリスチレン平型マイクロプレート (ヌンク社製) に 100 μL /ウェルで分注し、4℃で一晩静置した。18時間以上静置したマイクロプレートを最終濃度 0.05% Tween20を含む PBS 200 μL /ウェルで3~4回洗浄後、最終濃度 0.5% 牛血清アルブミン (BSA) と 0.05% Tween 20を含む 10 mM PBS (pH 7.2) 200 μL /ウェル加えて4℃一晩静置し、抗SRSV抗体固相マイクロプレートを作製した。

【0047】

実施例 5 交差反応性

(1) 抗原検出 ELISA

各精製 SRSV 中空ウイルス粒子をそれぞれ緩衝液 (10 mM PBS (pH 7.2) に最終濃度 0.2% 牛血清アルブミン (BSA) と 0.05% Tween 20を含む溶液) で 4000 ng/mL から 0.04 ng/mL まで希釈した。

次いで、希釈した各中空ウイルス粒子 (VLP) を、それぞれの抗SRSV抗体固相マイクロプレートのウェルに 100 μL 加え、室温 60 分間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度 0.05% Tween20を含む 10 mM PBS (pH 7.2) をウェルに 200 μL 加え、同様に吸引除去した。この操作を少なくとも3回行った。洗浄後、緩衝液で 1/10000 に希釈した各血清型の POD 標識抗SRSV抗体を 100 μL /ウェル加え、室温 60 分間反応させた。洗浄後、過酸化水素を含む TMB 溶液を 100 μL /ウェル加え、室温で 30 分間反応させた。反応後、0.6 N の硫酸を 100 μL /ウェル加え、ELISA オートリーダーでウェルの吸光度 (450 nm/630 nm) を測定した。結果を表 2 に示す。

【0048】

【表 2】

中空ウイルス粒子を用いた交差反応性		抗体固相プレート×POD標識抗体（1 段目株名，2 段POD標識抗体希釈倍率）						
		124	258	Chiba	104	76	47	7k
精製VLP	VLP濃度 (ng/mL)	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000
124	40.0 4.0 0.4	2.490 1.683 0.186	0.380 0.054 0.019	0.098 0.018 0.011	0.017 0.016 0.012	0.010 0.010 0.011	0.008 0.009 0.009	0.013 0.009 0.010
258	40.0 4.0 0.4	0.105 0.053 0.019	2.606 1.586 0.168	0.553 0.094 0.025	0.016 0.015 0.013	0.014 0.009 0.012	0.006 0.006 0.008	0.010 0.011 0.009
Chiba	40.0 4.0 0.4	0.131 0.024 0.016	0.349 0.056 0.019	2.167 0.347 0.082	0.015 0.015 0.014	0.007 0.008 0.009	0.008 0.009 0.009	0.013 0.013 0.011
104	40.0 4.0 0.4	0.011 0.015 0.014	0.020 0.012 0.011	0.008 0.008 0.009	1.539 0.233 0.058	0.016 0.009 0.008	0.018 0.008 0.008	0.018 0.010 0.010
76	40.0 4.0 0.4	0.012 0.015 0.016	0.018 0.015 0.014	0.008 0.007 0.008	0.106 0.031 0.018	2.490 1.198 0.130	0.077 0.019 0.012	0.046 0.019 0.010
47	40.0 4.0 0.4	0.012 0.013 0.010	0.018 0.016 0.011	0.008 0.011 0.009	0.134 0.033 0.017	0.081 0.018 0.015	1.673 0.289 0.077	0.034 0.017 0.014
7k	40.0 4.0 0.4	0.014 0.012 0.011	0.017 0.015 0.012	0.009 0.008 0.010	0.075 0.023 0.016	0.049 0.016 0.009	0.021 0.010 0.008	1.589 0.268 0.067
BLANK		0.052	0.012	0.008	0.014	0.008	0.006	0.010

【 0 0 4 9 】

これより、異なる遺伝子型 I と II の間で交差反応性は見られなかったことはもちろん同一遺伝子型間においても交差反応は見られず、用いた 1 0 種類のウイルス株の血清型はそれぞれ異なることが確認された。

【 0 0 5 0 】

試験例 1 S R S V の遺伝型の判別

遺伝子型 I に属する S R S V （ 6 4 5 株、 1 2 4 株、 2 5 8 株、 C h i b a 株

) の抗SRSV抗体を炭酸バッファー (pH 9.5) で0.5-10 μ g/mL濃度に希釈混合し、ポリスチレン平型マイクロプレート (ヌンク社製) に100 μ L/ウェルで分注し、4℃で一晩静置した。18時間以上静置したマイクロプレートを最終濃度0.05% Tween20を含むPBS 200 μ L/ウェルで3~4回洗浄後、最終濃度0.5%牛血清アルブミン (BSA) と0.05% Tween20を含む10mM PBS (pH 7.2) を200 μ L/ウェル加えて4℃一晩静置し、遺伝子型Iの各血清型に対する抗SRSV-IgG抗体を混合固相したマイクロプレート (I型プレート) を作製した。

次いで、遺伝型IIに属するSRSV (104株、809株、754株、76株、47株、7k株) の抗SRSV抗体を同様に固相してII型プレートを作製した。

SRSV患者の便 (0.5~1.0g) に9mLのPBSと1mLのダイフロンを加え、ホモジナイズした。次いで、19000gで20分間遠心してその上清を回収し、10%便乳剤とし、この10%便乳剤を緩衝液で等量希釈し、その希釈液をI及びII型プレートのウェルに100 μ L加え、室温60分間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度0.05% Tween20を含む10mM PBS (pH 7.2) をウェルに200 μ L加え、同様に吸引除去した。この操作を少なくとも3回行った。洗浄後、緩衝液で1/10000に希釈した各血清型のPOD標識抗SRSV抗体を100 μ L/ウェル加え、室温60分間反応させた。洗浄後、過酸化水素を含むTMB溶液を100 μ L/ウェル加え、室温で30分間反応させた。反応後、0.6Nの硫酸を100 μ L/ウェル加え、ELISAオートリーダーでウェルの吸光度 (450nm/630nm) を測定した。

【0051】

その結果、遺伝子型IのSRSVに感染した患者の便検体は、I型プレートにのみ反応しII型プレートに反応せず、遺伝型IIのSRSVに感染した患者の便検体は、II型プレートに反応しI型プレートに反応せず、遺伝子型の判別が実際に可能であることを確認した。

【0052】

試験例2 S R S Vの血清型の判別

S R S V (645株、124株、258株、Chiba株、104株、809株、754株、76株、47株、7k株)の各抗S R S V抗体をそれぞれ単独に炭酸バッファー (pH9.5) で0.5-10 μ g/mL濃度に希釈し、ポリスチレン平型マイクロプレート (ヌンク社製) に100 μ L/ウェルで分注し、4℃で一晩静置した。18時間以上静置したマイクロプレートを最終濃度0.05% Tween20を含むPBS 200 μ L/ウェルで3~4回洗浄後、最終濃度0.5%牛血清アルブミン (BSA) と0.05% Tween20を含む10mM PBS (pH7.2) を200 μ L/ウェル加えて4℃で一晩静置し、抗S R S V抗体固相マイクロプレート (血清型別プレート) を作製した。

S R S V患者の便検体に対し、試験例1と同様にELISAを行った。結果を表3に示す。

【0053】

【表3】

臨床試験

検体総数36

本発明キットによる型別	検出検体数
645型	1
124型	7
258型	4
Chiba型	1
104型	4
809型	12
754型	2
76型	3
検出合計	34 (94%)

【0054】

これにより、本発明のS R S V検出法によれば、94%という高い確率でSR

S Vを検出でき、且つその血清型を判別できることが明らかとなった。

尚、本発明のキットによりなされた型別は、P C R及び塩基配列の解析によりなされた型別と一致した（表4）。

【0055】

【表4】

血清型別の確認

検体総数34

本発明キットにより型別された検体		P C R及び塩基配列の解析により型別された検体
645型	1検体	1
124型	7検体	7
258型	4検体	4
Chiba型	1検体	1
104型	4検体	4
809型	12検体	12
754型	2検体	2
76型	3検体	3

【0056】

また、S R S V（645株、124株、258株、Chiba株、104株、809株、754株、76株、47株、7k株）の各抗S R S V抗体を炭酸バッファー（pH9.5）で0.5-10 μ g/mL濃度に希釈しこれらを全て混合し、又は混合してから希釈してものを用いて同様に抗S R S V抗体固相マイクロプレートを作製した。S R S V患者の便検体に対し、試験例1と同様にE L I S Aを行ったところ、全ての検体中のS R S Vを検出できた。

【0057】

【発明の効果】

本発明のS R S V検出キットによれば、簡易で且つ確実にこれまでに見出されている殆どのS R S V関連ウイルスを検出し、その血清型及び遺伝子型を判別す

ることができる。従って、S R S Vによる食中毒が発生した場合の感染ルートの特定、感染拡大の防止及び疫学調査等に有用である。

【 0 0 5 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>DENKA SEIKEN CO.,LTD.

<120>Kit for detecting SRSV

<130>P02481106

<160>11

<210>1

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>1

tgacctcgga ttgtggacag 20

【 0 0 5 9 】

<210>2

<211>31

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>2

gcgaattctt atctacggac accaagccta c 31

【 0 0 6 0 】

<210>3

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>3

gtgaatgaag atggcgtcga 20

【 0 0 6 1 】

<210>4

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>4

ccattataat gcacgcctgc gcc 23

【 0 0 6 2 】

<210>5

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>5

aatgatgatg gcgtctaagg a 21

【 0 0 6 3 】

<210>6

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>6

gccattatcg gcgcaracca agcc 24

【 0 0 6 4 】

<210>7

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>7

ttgtgaatga agatggcgtc ga 22

【 0 0 6 5 】

<210>8

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>8

ccataactga acccttctac gcc 23

【 0 0 6 6 】

<210>9

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>9

tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttt 33

【 0 0 6 7 】

<210>10

<211>28

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>10

aattactgaa cccttctacg cccatttc 28

【 0 0 6 8 】

<210>11

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>11

aattattgaa tccttctacg cccg 24

【図面の簡単な説明】

【図 1】

S R S V の遺伝子構造と P C R 増幅領域を示した図である。

【図 2】

124 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

【図 3】

258 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

【図 4】

C h i b a 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

【図 5】

104 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

【図 6】

809 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

【図 7】

754 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

【図 8】

76 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)

。

【図 9】

47 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)

。

【図 10】

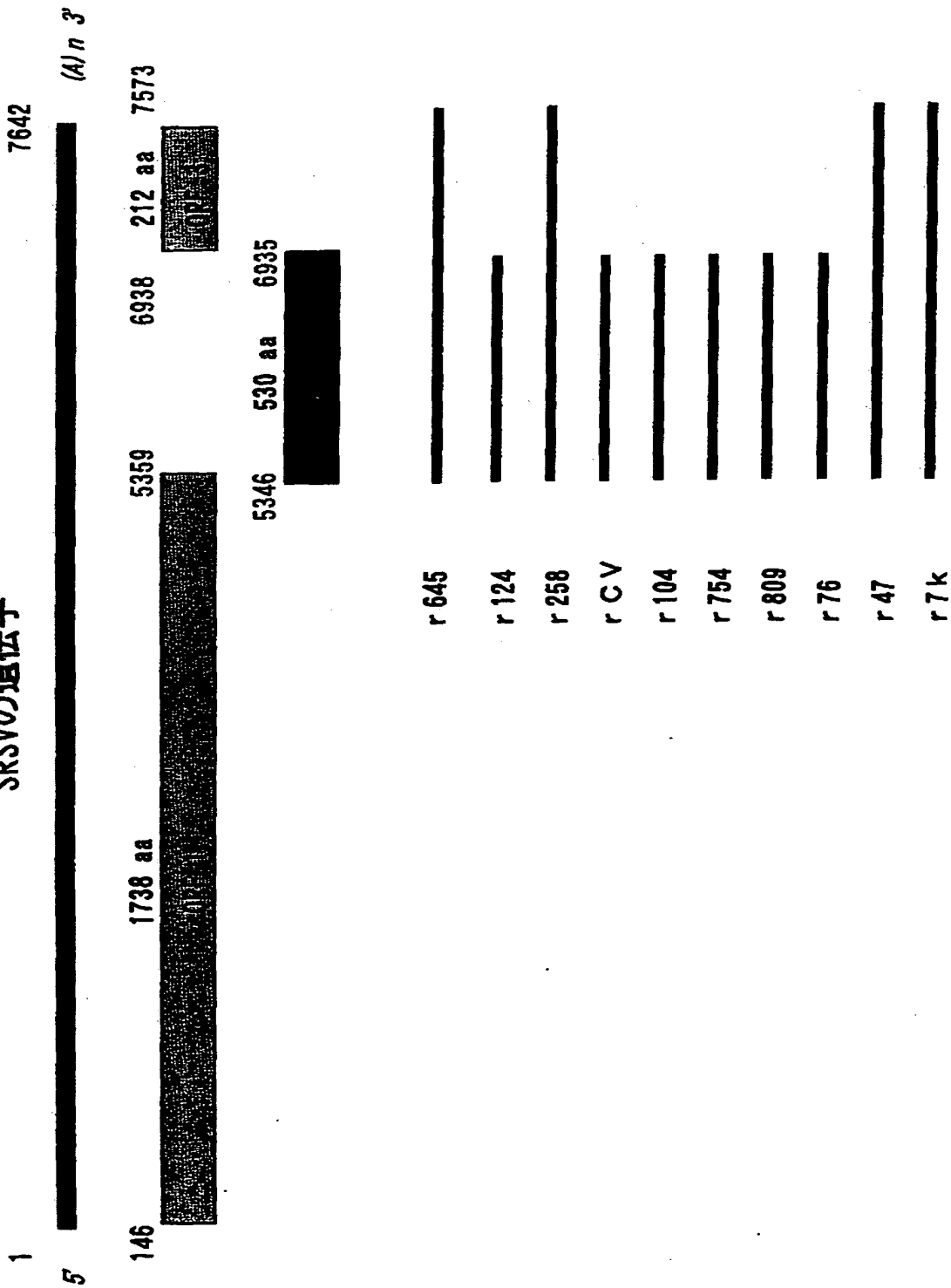
7k 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)

。

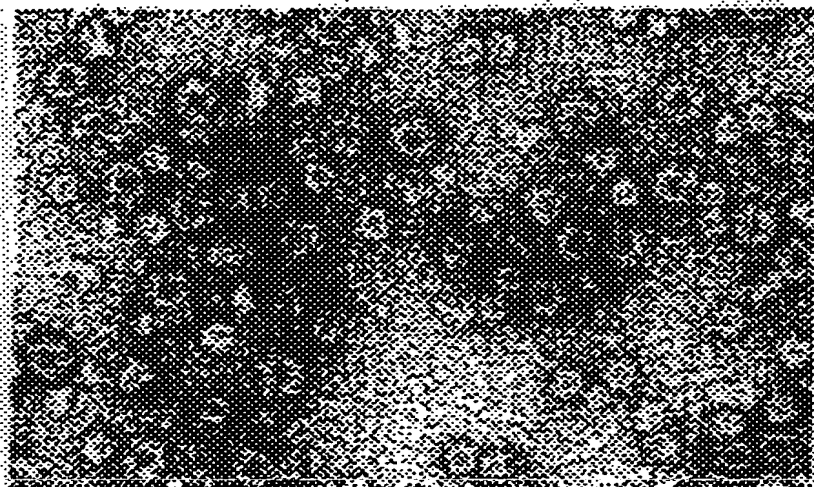
【書類名】 図面

【図 1】

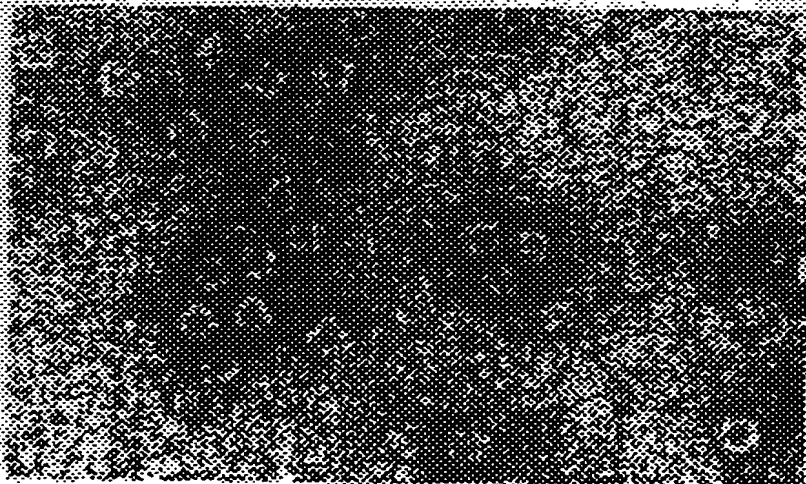
SRSVの遺伝子



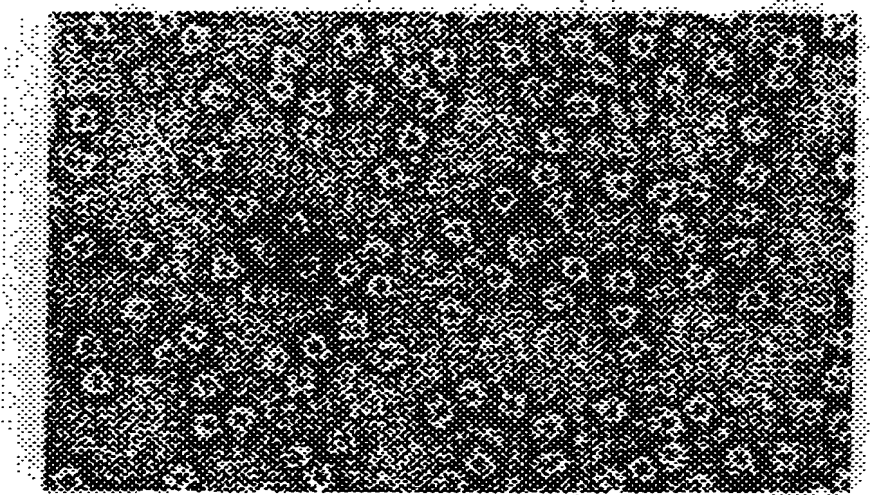
【図2】



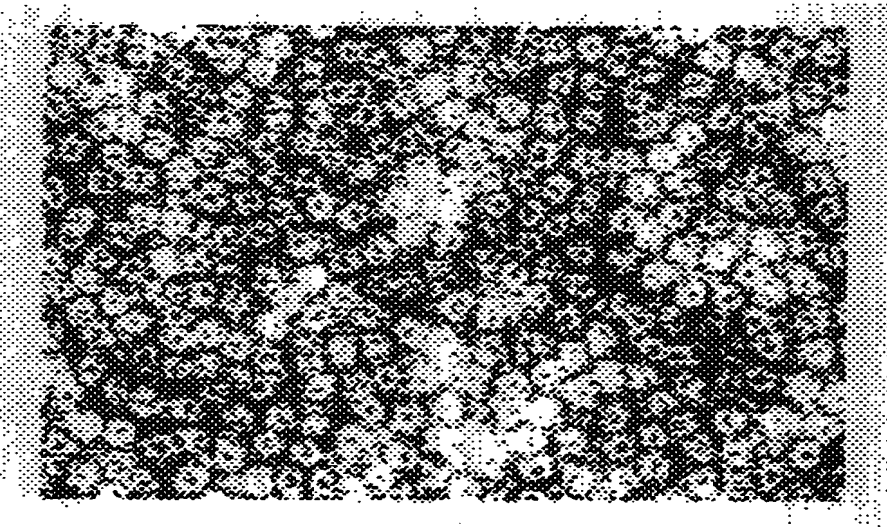
【図3】



【図 4】



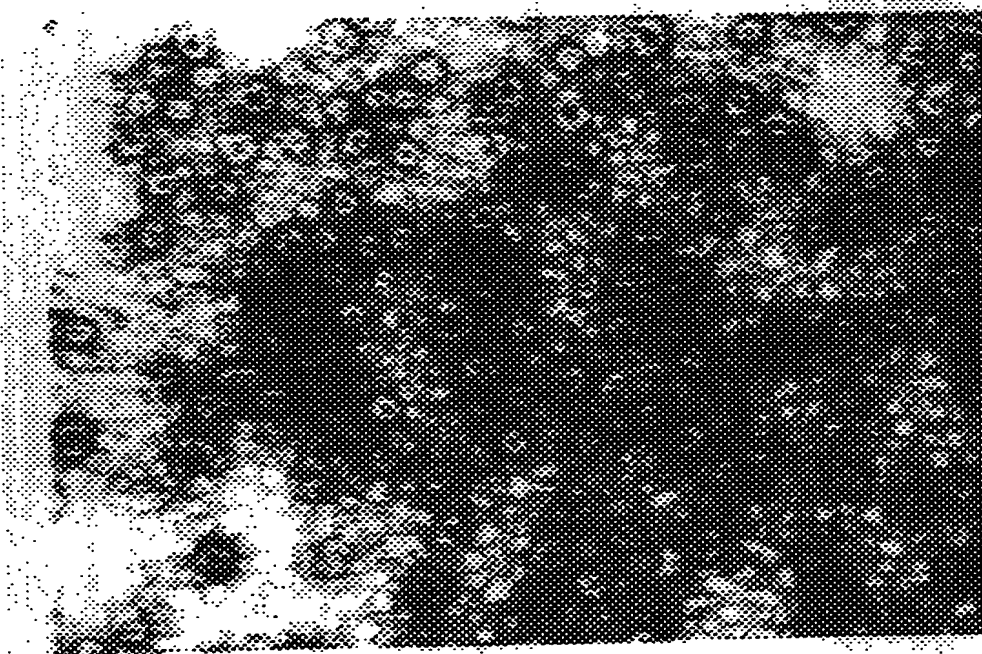
【図 5】



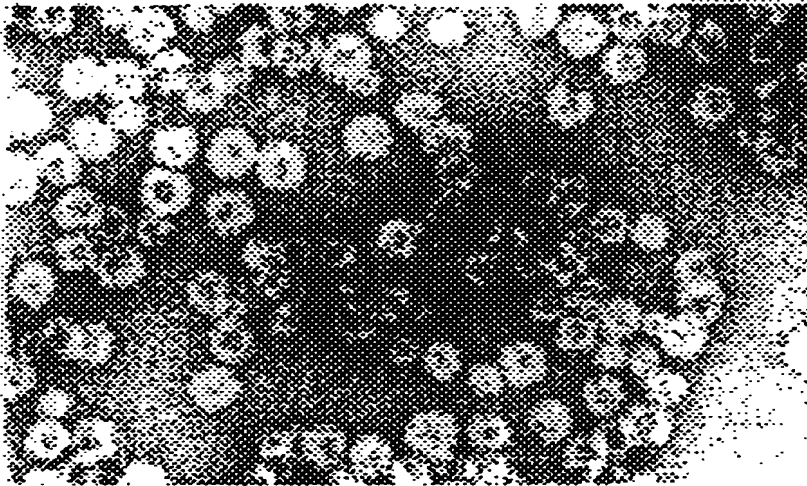
【図6】



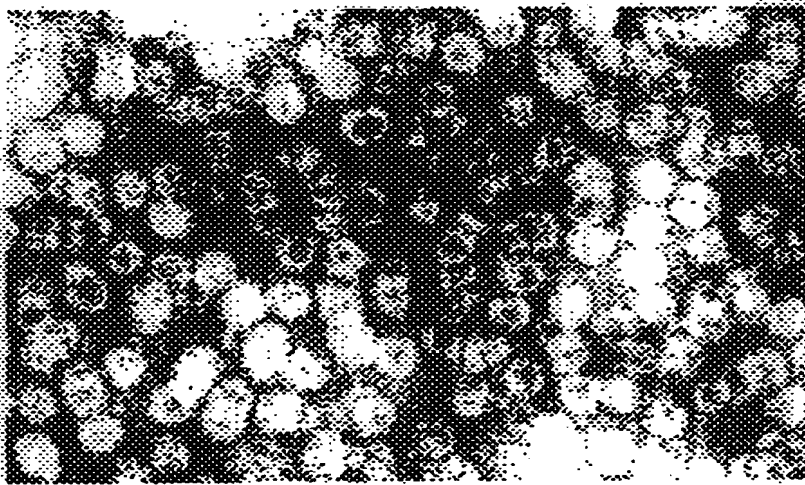
【図7】



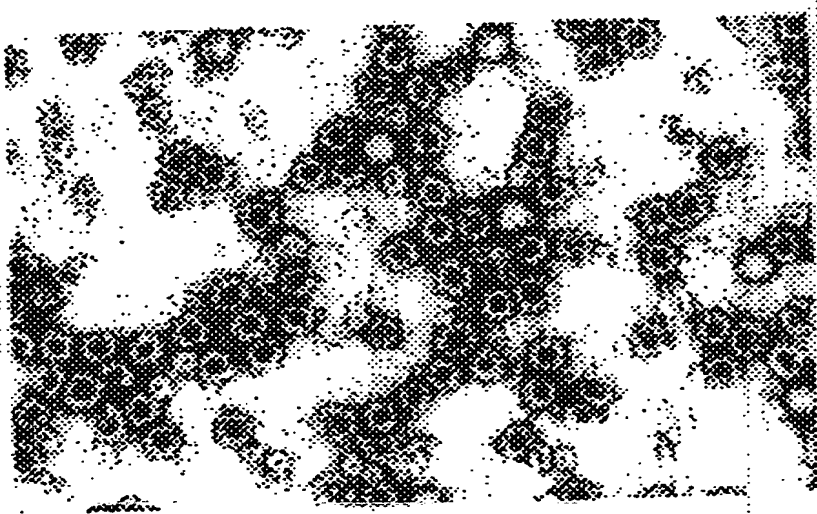
【図8】



【図9】



【図 1 0】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 下記SRSV関連ウイルス(a)～(j)よりなる群から選択された一つのウイルス株に対する抗体を全て含有することを特徴とするSRSV検出キット；

(a) 645株等、(b) 124株等、(c) 258株等、(d) Chiba株等、(e) 104株等、(f) 809株等、(g) 754株等、(h) 76株等、(i) 47株等、(j) 7k株等。

【効果】 簡易で且つ確実に殆どのSRSV関連ウイルスを検出し、その血清型及び遺伝子型を判別することができる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591222245]

1. 変更年月日	1997年 6月12日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都新宿区戸山一丁目23番1号
氏 名	国立感染症研究所長

特平 11-175928

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591125371]

1. 変更年月日 1997年 6月12日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区日本橋茅場町三丁目4番2号

氏 名 デンカ生研株式会社